

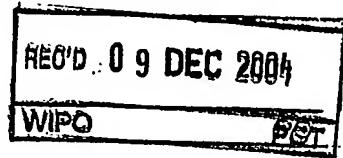
12.11.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年10月24日



出願番号
Application Number: 特願2003-365178

[ST. 10/C]: [JP2003-365178]

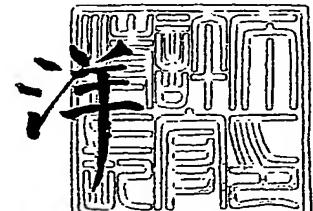
出願人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3099706

【書類名】 特許願
【整理番号】 2003YS1024
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K
C12N

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及
血清療法研究所 菊池研究所内
【氏名】 松山 玲子

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及
血清療法研究所 菊池研究所内
【氏名】 前田 浩明

【特許出願人】
【識別番号】 000173555
【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
【代表者】 内野 精自

【代理人】
【識別番号】 100081581
【弁理士】
【氏名又は名称】 内山 美奈子
【電話番号】 06-6343-0160

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 047614
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成15年10月24日提出の包括委任状

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

動物細胞にタンパク質産生遺伝子とカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を発現可能に形質転換させたことを特徴とするタンパク質高産生組換え動物細胞。

【請求項 2】

動物細胞にタンパク質産生遺伝子とカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を同時に異なる時期に形質転換させたことを特徴とするタンパク質高産生組換え動物細胞の作製方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の該タンパク質高産生組換え動物細胞を用いた導入タンパク質の製造方法において、該細胞内において、カスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするタンパク質産生量を増加させる方法。

【請求項 4】

該カスペース活性阻害因子をコードする遺伝子がウイルス由来の、バキュロウイルスP35遺伝子、牛痘ウイルスcrmA遺伝子、ヘルペスウイルス由来のv-FLIP遺伝子、バキュロウイルスv-IAP遺伝子、アデノウイルスAd14.7遺伝子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

カスペース活性阻害因子をコードする遺伝子がバキュロウイルスを除くウイルス及び動物細胞由来のバキュロウイルスIAP反復配列を持つIAPファミリー遺伝子であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

産生されるタンパク質が分泌タンパク質であることを特徴とする請求項 3 ないし 5 記載の何れかの方法。

【請求項 7】

産生されるタンパク質が血液中に存在するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 ないし 6 記載の何れかの方法。

【請求項 8】

産生されるタンパク質がフィブリノゲンであることを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

動物細胞が、哺乳動物由来の細胞であることを特徴とする請求項 3 ないし 8 記載の何れかの方法。

【請求項 10】

哺乳動物由来細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスマミエローマ細胞、BHK 細胞、293細胞及びCOS細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

哺乳動物由来細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)DG44株であることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター及びニワトリ β -アクチンプロモーターからなる群より選択されるプロモーター並びに、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子及びグルタミン合成酵素(GS)遺伝子からなる群より選択されるマーカー遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項 3 ないし 11 記載の何れかの方法。

【請求項 13】

ニワトリ β -アクチンプロモーター及びバキュロウイルスP35遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 14】

サイトメガロウイルスエンハンサー及びバキュロウイルスP35遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項15】

フィブリノゲン遺伝子及びバキュロウイルスP35遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項8ないし12記載の何れかの方法。

【請求項16】

無血清培地を用いることを特徴とする請求項3ないし15記載の何れかの方法。

【請求項17】

タンパク質の產生量を約31倍まで増加させることを特徴とする請求項3ないし16記載の何れかの方法。

【請求項18】

タンパク質の產生量を約3344 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで増加させることを特徴とする請求項3ないし16記載の何れかの方法。

【請求項19】

タンパク質產生遺伝子がフィブリノゲン產生遺伝子であることを特徴とする請求項1記載のタンパク質高產生組換え動物細胞。

【請求項20】

動物細胞にカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を形質転換させたことを特徴とする高產生用宿主動物細胞。

【請求項21】

動物細胞にカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を導入することを特徴とする高產生用宿主動物細胞を作製する方法。

【請求項22】

動物細胞にカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子を導入して高產生用宿主動物細胞を作製し、該細胞にカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子の導入時に使用した選択マーカーとは異なる選択マーカーを使用してタンパク質產生遺伝子を導入し、得られたタンパク質高產生組換え動物細胞の選択増殖を行うことによる導入タンパク質の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規なタンパク質高産生組換え細胞、その作製方法及びそれを用いたタンパク質産生量を増加させる方法

【技術分野】

【0001】

本願発明は、タンパク質を高生産する組換え動物細胞の作製方法及びそれを用いたタンパク質産生量の増加方法に関する。更に詳細には、バキュロウイルスP35に代表されるカスペース活性を直接阻害する因子の遺伝子を動物細胞に導入することによって目的タンパク質を多量に産生する組換え動物細胞を作製し、その遺伝子を発現させることによって目的タンパク質の産生量を増加する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子組換え技術を用いて医薬品などに利用可能なタンパク質を作る試みが盛んに行われている。分子サイズの大きなタンパク質や糖鎖の付加など種々の修飾、また複数のポリペプチド鎖からなるサブユニット構造のタンパク質は、酵母や大腸菌などの微生物を宿主とした発現系では対応できないので、動物細胞を宿主とした産生系を用いる場合が多い。動物細胞の中でも哺乳動物細胞を用いて産生させる場合が多い。タンパク質が分泌タンパク質の場合、培養上清に目的タンパク質が回収できるので、一般的に、適当な培地中で組換え動物細胞を培養し、一定期間培養した後、培養上清を一括して回収する（バッチ培養）か、隨時適定量の培地の抜き取り、添加を連続的に行う方法（パーフジョン培養）が用いられている。いずれにしても、目的分泌タンパク質を産生する動物細胞の数の増加とともに分泌タンパク質の培地への蓄積（産生）量が増加する。細胞の増殖は、細胞が対数的に増殖する対数期と細胞数が見かけ上一定の定常期、それから細胞が死滅し、数が減少する死滅期の3つの期間に分けられる。分泌タンパク質の産生を増加させるためには、定常期での組換え動物細胞の細胞密度を可能な限り高くし、その期間をできるだけ長く維持することが重要である。特に、バッチ培養の場合、一定量の培地の中で組換え動物細胞を増殖させてるので、この中で分泌タンパク質の産生量を伸ばすために定常期の細胞密度を可能な限り高くし、なおかつその時期をできるだけ維持しようと様々な試みがなされてきた。

【0003】

定常期を長く維持する試みとして、育種の観点から、培地成分に改良を加え、増殖因子添加など栄養成分を工夫することで増殖性を良くし、定常期を延長させる方法がとられてきた。また、培養方法として、フェド・バッチ培養法のように定常期の細胞に対して栄養分の追加補充を適当なインターバルで行い、栄養枯渇を防ぐことによって、定常期を長く伸ばす方法がある。パーフジョン法はこれを連続的に行う方法である。目的タンパク質の産生量を増加させるために、通常はこのような育種的な方法がとられてきた。このような育種的な方法とは別の方法として、宿主細胞を改造する試みも行われてきた。例えば、細胞死抑制因子(anti-apoptotic factor)を用いる方法が試みられている。この方法は細胞死抑制因子遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞中で発現させ、その細胞に栄養飢餓などによって生じるプログラムされた細胞死（アポトーシス）を抑制する能力を付与し、定常期を延長しようという試みである。

【0004】

アポトーシスの起こるメカニズムとして非特許文献1によれば、次のように考えられている。栄養枯渇などの様々な細胞死刺激が細胞に伝わると転写因子やキナーゼを含む各種タンパク質を介して、そのシグナルはミトコンドリアに伝達される。シグナルをうけたミトコンドリアはアポトーシスシグナル伝達因子（AIF、シトクロムcなど）を細胞質中に放出する。シトクロムcは細胞質に存在するApaf-1(apoptosis activating factor-1)とpro-caspase-9に結合し複合体を形成し、caspase-9を活性化する。活性化されたカスペースカスケードは細胞質内あるいは核内の各種基質を切断し、様々なアポトーシスに特徴的な形態学的、生化学的变化（アクチン分解、DNA断片化、染色体凝集など）を誘導する。

このようなアポトーシスを抑制する因子としてBcl-2(B cell lymphoma/leukemia 2)がよく知られている。Bcl-2遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫に高頻度に見られる癌遺伝子として発見された。現在Bcl-2に相同意の高いドメイン(BH1-4)をもつ多くのファミリー遺伝子が同定されている。ファミリーにはアポトーシスに抑制的に働く因子と促進的に働く因子があり、抑制的因子として、例えばBcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1、BHRF1、E1B-19K、Ced-9などが知られており、前述のシトクロムc放出阻害や、Apaf-1とprocaspase-9に結合することによってシグナル伝達を阻止していると考えられている。このように抑制的なBcl-2ファミリーはカスペースカスケードの上流で機能すると考えられている。

【0005】

一方、カスペースカスケードの下流に作用（カスペースの活性を直接的に阻害）して細胞死抑制効果を示す因子も知られている。例えば、バキュロウイルス科に属するAcNPV (A utographa californica nuclear polyhedrosis virus)のp35タンパク質はカスペースの基質として切断され、その断片がほとんど全てのカスペースと安定的な複合体を形成してその活性を阻害する。従って、種々のアポトーシスを抑制することができる。AcNPVに近縁なBmNPV (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus)もp35遺伝子を持っている。また、牛痘ウイルスのcrmAはcaspase-1様プロテアーゼやcaspase-8,-10に特異的に結合し、これを阻害することによりアポトーシスを抑制できる。また、ヘルペスウイルス由来のv-FLIPは2つのDED(death effector domain)ドメインを持ち、FADD (Fas-associating Protein with death domain)と結合することによって caspase-8の活性化を抑制する。さらに、バキュロウイルス科のCpGV(Cidia pomonella granulosis virus)やOpMNPV (Orgyia pseudotsugata multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus)をはじめとする多くの類縁のウイルスには、p35遺伝子とは別に、その発現産物がカスペース活性を直接阻害するv-IAP(inhibitor of apoptosis)遺伝子が同定されている。現在までにv-IAPのホモログとして、ウイルス以外にショウジョウバエや哺乳類でc-IAP1/hia-2、c-IAP2/hia-1、XIAP、NAIP、survivin、TIAP、Apollon、DIAP1、DIAP2、SfIAP、ITAなど数種類のBIR (baculovirus IAP repeat)を持つIAPファミリーが同定されている。

【0006】

このような抗アポトーシス活性をもつ因子、例えばBcl-2ファミリーなどを細胞培養に利用しようと試みられてきたが、今のところ、Bcl-2ファミリーについてはタンパク質の産生量増強に対する効果ははっきりしていない。例えば、Tey BTらはキメラ抗体を産生するCHO細胞にBcl-2遺伝子を導入して発現させた場合に、生存率の延長効果を認めたが、抗体産生量に変化はなかった（非特許文献2参照）。Simpson NHらはハイブリドーマにBcl-2遺伝子を導入したが、やはり抗体産生能力の上昇にはつながらなかった（非特許文献3参照）。同様に、Kim NS, Lee GMらも、バッチャ培養においてBcl-2遺伝子を発現させた抗体産生CHO細胞は発現させない場合に比べて抗体産生量にはほとんど変化は認められないことを報告している（非特許文献4、5参照）。一方、彼らは酪酸ナトリウムを同時に添加した場合に酪酸の持つアポトーシス誘導作用をBcl-2が抑制し、結果的に酪酸の持つ産生量増強作用を強化することによって抗体産生量をアップさせている（非特許文献5参照）。また、彼らは同様にBcl-2発現が高浸透圧による細胞死を抑制することを見出し、高浸透圧による抗体産生増強効果を助けることによって、産生量アップできることを報告している（非特許文献6参照）。これらの報告は、Bcl-2が細胞死抑制効果を發揮しても、抗体のような分泌タンパク質の産生増強効果に直接的に関わるものでないことを示している。また、Bcl-2、Bcl-xL、E1B-19Kの発現は細胞増殖を減じる方向に作用することも報告されている（非特許文献7参照）。同様に、Bcl-2ファミリーであるMCL-1も細胞の生存率を向上させるが、細胞増殖のシグナルに影響を与えない（非特許文献8参照）。Bcl-xLについても同様に細胞生存率を向上させるが、分泌タンパク質の産生量向上には寄与しないとの報告がある。例えば。インスリンのプロモーターの制御下でBcl-xLを発現できるようにした遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスにおいて、Bcl-xLはβ細胞の生存率を向上させたが、グルコース誘導によるインスリンの分泌発現を増強するどころか減少させた（非特許文献9参照）。同様に、Bcl-xLを発現させたRAW264マクロファージ細胞を用いてLP

S誘導によるTNF α などの炎症性サイトカインの産生を調べたところ、産生量を減少させている（非特許文献10参照）。同様にBcl-2ファミリーであるE1B-19K遺伝子を抗体産生NS/0ミエローマに導入したが、産生量について改善は認められなかった（非特許文献11参照）。

【0007】

このように、これまで試されたBcl-2、Bcl-xL、E1B-19KなどのBcl-2ファミリー由来の細胞死抑制因子を用いた方法はいずれも細胞死を抑制し、増殖曲線の定常期を延長することができたにもかかわらず、期待通りには産生量が増加しない場合が多い。これらのことから、これらの因子には直接的なタンパク質の産生量を増強する効果はないか、あっても特殊な環境下で発揮されると考えられる。一方、バキュロウイルスのP35に代表されるカスペース阻害作用を持つ因子については組換えタンパク質産生細胞において産生量増強効果との関連を調べたとの報告はなく、ましてや組換え分泌タンパク質産生細胞においてその産生量増強効果があるとの報告などなかった。

【0008】

本発明では本発明の対象とするタンパク質の一例としてフィブリノゲンを用いている。フィブリノゲンは、血液凝固因子の一つとして、生体が傷害を受けた時に血液を凝固する働きを担う。第一の機能は損傷部位でフィブリントロットと呼ばれる血栓の本体を形成することであり、第二の機能は、血小板凝集に必要な粘着タンパク質として働くことである。フィブリノゲンの血中濃度は、通常約3mg/mlであり、アルブミン、免疫グロブリンGについて3番目に高い。フィブリノゲンは、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖と呼ばれる3種の異なったポリペプチドを2本ずつ有する計6本のポリペプチドからなる巨大糖蛋白質である。ポリペプチドの個々の分子量は α 鎖が約67000、 β 鎖が約56000、 γ 鎖が約47500であり、これらが集合したフィブリノゲンの分子量は、約340000に達する（非特許文献12参照）。血中のフィブリノゲンには、分子サイズの異なる異型ポリペプチドを有することに起因するヘテロな分子が存在する。例えば、 γ 鎖には γ' 鎖（あるいは γ B鎖）と呼ばれる異型の存在が報告されており、これは、 γ 鎖のアミノ酸配列の408位に20個のアミノ酸残基が付加した計427個のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが明らかにされている（非特許文献13参照）。また、 α 鎖にも α Eと呼ばれる異型が存在し、このポリペプチドは、 α 鎖のアミノ酸配列の612位に236個のアミノ酸残基が伸長した計847個のアミノ酸残基を有することが報告されている（非特許文献14参照）。

【0009】

フィブリノゲン製剤は、静脈投与するなどの方法により血液中のフィブリノゲン濃度を高めることによって重篤な出血を阻止するのに効果的であり、たとえば敗血症における汎発性血管内凝固症候群（DIC）のような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。また、フィブリノゲンの膠着性を利用した組織接着剤としても広く利用されている（非特許文献15参照）。この生体由来接着剤は、フィブリノゲンが生体内でゲル化することを利用したもので、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアーリークの閉鎖など広範にわたって使用される。また、近年フィブリノゲンをコラーゲンなどのシートに付着させることにより利便性を高めた製剤も販売されている。

【0010】

現在、医薬品として用いられているフィブリノゲンはヒト血漿から調製されたもので、その問題点として、1) 不特定多数のヒトから集めた血漿を使用するために、HAV、HBV、HCV、HEV、TTVなどの肝炎を引き起こすウイルス、HIVなどの免疫不全症を引き起こすウイルス、CJDを引き起こす異常プリオンなどの感染性病原体混入の危険性があること、2) また、日本では血漿は献血によって供給されており、将来的な安定供給が問題視されること、などが挙げられている。

これらの問題を解決するために、従来からフィブリノゲンの組換え化が試みられてきた。例えば、大腸菌では、フィブリノゲン γ 鎖の菌体内発現には成功しているが、 α 鎖、 β 鎖

、 γ 鎖の3つのタンパク質を同時に発現させ、機能的なフィブリノゲン分子を產生させたとの報告はない。また、酵母を用いた発現系でも一時期分泌発現に成功したとの報告もあったが、最終的には再現性が取れずその報告を取り下している（非特許文献16参照）。このように、未だ、大腸菌や酵母を用いてフィブリノゲンを発現させることに成功したとの報告はない。

【0011】

一方、動物細胞では、BHK細胞（非特許文献17参照）やCOS細胞（非特許文献18参照）、CHO細胞（非特許文献19、20、21及び特許文献1参照）を用いて発現が試みられているが、その產生量は、1～15 μ g/ml程度にとどまっている。これらの場合、メタロチオネインプロモーター、Rous sarcoma virus LTRプロモーター、adenovirus 2 major 1 late プロモーターのいずれかを用い、選択マーカーとしてアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、histidinol耐性遺伝子のいずれか若しくはこれらの組み合わせで使用している。いずれの場合も、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖を各々コードする遺伝子の発現ベクターを各々単独に構築し、3者で同時にトランスフェクションするか、あるいは α 鎖、 γ 鎖若しくは β 鎖、 γ 鎖遺伝子を有する各々2つの発現ベクターで先に形質転換した細胞に、後から β 鎖、 α 鎖遺伝子を有する発現ベクターを導入する方法、さらには α 鎖と γ 鎖遺伝子を有するプラスミドと β 鎖遺伝子を有するプラスミドを等量混合して導入する方法がとられている。いずれの場合も特に導入する際の各遺伝子の構成比に関する記載はなく、一般的な手法通りに各遺伝子を均等に導入していると思われる。現在使用されている血液由来のフィブリノゲンを用いた医薬品では、例えば、フィブリン糊製剤では約80mg/doseのフィブリノゲンが使われており、前述の十数 μ g/ml程度の発現量では製造施設が大規模にならざるを得ず、必然的に高コストになってしまう。遺伝子組換え技術によりフィブリノゲンを実用的なレベルで製造するためには高產生細胞（例えば、フィブリノゲンの発現量が100 μ g/ml以上）が必要であるが、現在、これを満足する動物細胞を用いた発現系の報告はみられない。

【0012】

【特許文献1】United States Patent 6037457

【0013】

【非特許文献1】「アポトーシスと疾患 中枢神経系疾患編」水野美邦編、医薬ジャーナル(2000)

【非特許文献2】Tey BTら, Biotechnol. Bioeng., 68, 31 (2000)

【非特許文献3】Simpson NHら, Biotechnol. Bioeng., 64, 174 (1999)

【非特許文献4】Kim NSとLee GM, Biotechnol. Bioeng., 82, 872 (2003)

【非特許文献5】Kim NSとLee GM, Biotechnol. Bioeng., 71, 184 (2000/2001)

【非特許文献6】Kim NSとLee GM, J. Biotechnol., 95, 237 (2002)

【非特許文献7】O'Reilly LAら, EMBO J., 15, 6979 (1996)

【非特許文献8】Yang Tら, J Cell Physiol., 166, 523 (1996)

【非特許文献9】Zhou Yら, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 278, E340 (2000)

【非特許文献10】Lakics Vら, J. Immuno., 165, 2729 (2000)

【非特許文献11】Mercille Sら, Biotechnol. Bioeng., 63, 516 (1999)

【非特許文献12】「止血・血栓・線溶」松田、鈴木編集、中外医学社 (1994)

【非特許文献13】Chung DEとDavie EW, Biochemistry, 23, 4232 (1984)

【非特許文献14】Lawrence YFら, Biochemistry, 31, 11968 (1992)

【非特許文献15】「特集・生体接着剤」Biomedical Perspectives, 6, 9-72 (1997)

【非特許文献16】Redman CMとKudryk B, J. Biol. Chem., 274, 554 (1999)

【非特許文献17】Farrell DHら, Biochemistry, 30, 9414 (1991)

【非特許文献18】Roy SNら, J. Biol. Chem., 266, 4758 (1991)

【非特許文献19】Lord STら, Blood Coagul Fibrinolysis, 4, 55 (1993)

【非特許文献20】Binnie CGら, Biochemistry, 32, 107 (1993)

【非特許文献21】Lord STら, Biochemistry, 35, 2342 (1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

以上述べてきたように、タンパク質、特に分泌タンパク質を产生している組換え動物細胞の培養においては产生量を増加させるために如何に細胞密度を高密度にするか、如何に増殖曲線の定常期を長く維持するかが問題となっていた。しかし、フェドバッチ培養のように枯渇した栄養因子を追加して定常期を延長させる方法や、アミノ酸や増殖因子を加えるなど栄養条件を良くして細胞の増殖性を上げ、細胞密度を上げる方法などの育種方法以外に効果的な解決策は見出されていないのが現状であった。従って、育種的な方法に代わる、あるいは育種的な方法と併用できる細胞の培養条件を改善・改良する新たな方法が望まれていた。

【0015】

従って、本願発明は、育種的な方法以外にタンパク質、特に分泌タンパク質を产生している組換え動物細胞の培養条件を改善・改良する方法を提供することを目的とする。

【0016】

また、本願発明の他の目的は、当該方法によって得られるタンパク質、特に分泌タンパク質を高產生する組換え動物細胞ならびに当該方法によって得られたタンパク質を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本願発明者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、产生されるタンパク質の一例として従来技術では大量產生の難しかったフィブリノゲンを用い、抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカスペース活性を阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、望ましくはバキュロウイルスP35遺伝子を、タンパク質を產生している組換え動物細胞内で発現させることにより、従来になかったタンパク質產生能の増強効果を見出し、本願発明を完成するに至った。

【0018】

従って、本願発明は、抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカスペース活性を阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、望ましくはバキュロウイルスP35遺伝子を用いて動物細胞を形質転換する工程を含む組換え動物細胞の作製方法を包含する。

【0019】

また、本願発明は、上記の方法により得られたタンパク質を高発現する組換えタンパク質產生細胞及び当該細胞によって得られたタンパク質を包含する。

【発明の効果】

【0020】

本願発明の方法によって作製された目的タンパク質を高產生する動物細胞は、細胞増殖における定常期の期間を延長する以外に、細胞増殖能力を増強する効果も認められ、従来Bcl-2などで報告されていた生存率の延長効果以外の能力も獲得できるようになる。フィブリノゲン產生細胞及びバキュロウイルスP35を一例としてその効果を調べた結果、従来技術によるフィブリノゲンの產生量は最大約 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合で最終的に約31倍の產生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約 $704\sim3344\mu\text{g}/\text{ml}$ の潜在的な產生量をもつと推定される。このように本願発明の方法によって、これまでにない目的タンパク質を高產生する組換え細胞が得られる。本願発明は、フェドバッチ培養など育種方法との併用も可能であるので、その場合、組換え細胞のタンパク質產生能をさらに増強することができる。故に、本願発明は、従来では動物細胞での生産性が低く、産業化が難しかったタンパク質の事業化ならびに、すでに事業化されているタンパク質生産においてもさらなる產生量増強によ

る大幅なコストダウンを可能にするものである。

【0021】

本願発明の一例として示した組換えヒトフィブリノゲン産生細胞においても、本願発明によって初めて実用的なレベルでのヒトフィブリノゲンの製造方法の確立を可能にし、当該製造方法が確立されることによってヒトフィブリノゲンの市場への安定供給が確保される。また、本願発明の方法より得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞を用いれば、従来の血液を原料として製造した場合に危惧される感染性病原体の混入やその他の血液由来成分の関与を排除することができ、より安全なヒトフィブリノゲン製剤を製造・供給することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本願発明の方法は、タンパク質を産生している宿主動物細胞に抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカスペース活性を直接阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、例えばバキュロウイルスP35遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞内で発現させる工程を含むタンパク質を高産生する組換え動物細胞を用いる方法によって特徴付けられる。

【0023】

カスペースを阻害する作用を持つ因子としては、ペプチド性抑制因子、タンパク質抑制因子など遺伝子発現により得られるものであれば、いかなるものでも効果を発揮できる可能性があるが、望ましくは、ウイルス由来のものであれば、バキュロウイルス (AcNPVあるいはBmNPV) のP35遺伝子、牛痘ウイルスcrmA遺伝子、ヘルペスウイルス由来のv-FLIP遺伝子、バキュロウイルスv-IAP遺伝子、アデノウイルスAd14.7遺伝子、バキュロウイルス由来v-IAPとホモロジーのある他のウイルス性因子などが挙げられる。また、ウイルス由来以外のものであれば、バキュロウイルス由来v-IAPとホモロジーのある動物細胞由来のBIR (baculovirus IAP repeat)を持つIAPファミリーが挙げられる。そのような因子の例として、ショウジョウバエや哺乳類で見出されたc-IAP1/hia-2、c-IAP2/hia-1、XIAP、NAIP、survivin、TIAP、Apollon、DIAP1、DIAP2、SfIAP、ITAなどが挙げられる。これらの因子の中でもバキュロウイルスAcNPVのP35遺伝子が最も好ましい一例としてあげられる。

【0024】

産生量増強の対象となるタンパク質であるが、各種宿主動物細胞に遺伝子を導入することによって発現させることができるタンパク質であれば、どのようなタンパク質でも対象となるが、望ましくは宿主細胞の増殖とともに産生量も増加するタンパク質が対象となる。さらに、どのようなタンパク質の中でも、培養上清中に発現産物が回収できる分泌タンパク質が最も望ましい対象タンパク質である。そのようなタンパク質の例として、抗体、サイトカイン類、成長因子類、ホルモン類、血漿タンパク質、酵素類、レセプター、リガンド、代謝産物、ウイルス、ウイルスタンパク質などが挙げられる。本願発明では、そのようなタンパク質の一例として、ヒト由来のフィブリノゲンを取り扱うが、これに限定されるものではなく他のタンパク質産生細胞を作製する方法としても用いることができる。

【0025】

本願発明で一例として用いているヒトフィブリノゲンの構成ポリペプチド、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子としては、最終的に発現産物がアッセンブルしてヒトフィブリノゲン分子を形成できる遺伝子であれば、cDNA及び染色体遺伝子の何れも使用できる。前述したように、 α 鎖及び γ 鎖には、それぞれ α E鎖及び γ' (γ B) 鎖と呼ばれる異型が存在する。これらに加えて今後新たに見出されるかもしれない他の異型ポリペプチドをコードする遺伝子も、同様に、本願発明に使用することができる。

【0026】

これまで述べてきた所望の遺伝子は、それぞれの遺伝子の核酸塩基配列を記した文献や、GENBANK(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)などの既存の遺伝子データベースを利用することによって核酸塩基配列を入手し、その配列を元にPCR用プライマーをデザインして適当な遺伝子ソースとなる細胞や組織、ウイルスのRNAやDNA、mRNA由来のDNAを鋳型

として、通常のPCR法によりクローニングすることができる。例えばバキュロウイルスP35遺伝子の場合は、文献 (Friesen, P. D. and Miller, L. K., J. Virol. 61, 2264-2272 (1987)) に報告されている配列を、フィブリノゲン遺伝子の場合は、文献 (Rixon MWら, Biochemistry, 22, 3237 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3244 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3250 (1983)、非特許文献13、14参照) に各々報告されている配列を元にPCR用プライマーをデザインし、前者の場合はバキュロウイルス感染細胞やウイルスゲノムそのものを鋳型にして、後者の場合はヒト肝臓などフィブリノゲンを產生している臓器や細胞由来のcDNAを鋳型にしてPCRを行うことにより取得できる。

【0027】

より具体的には、前者の場合、ウイルスゲノムDNAあるいはRNAは一般的には以下のような方法によって調製可能である。ウイルス感染細胞からDNAを抽出する場合、細胞沈査に對してSDS及びプロテナーゼKを含む可溶化バッファー (組成の一例: 150mM-NaCl, 10mM-Trais-HCl pH8.0, 10mM-EDTA, 0.1%-SDS, プロテナーゼ K 100ug/ml) を10倍以上加え、37°Cで数時間～一夜、穏やかに振盪することで蛋白成分を分解する。その後は、通常のDNA抽出の手法に従い、フェノール処理、エタノール沈殿によりDNAを回収する (中西広樹・西方人著、バイオ実験イラストレイテッド第二巻、P117-123、1997、秀潤社)。一方、ウイルス粒子からDNAまたはRNAを抽出する場合は、まず培養上清あるいは増殖に用いた発育鶏卵の腔液から一般的には超遠心によりウイルス粒子を濃縮する方法が用いられる。超遠心の条件はウイルス毎に多少異なるが、主なウイルスの精製法についてはウイルス実験プロトコール (永井美之・石浜明監修、メジカルビュー社、1995年) に記載されている。精製されたウイルス粒子からの核酸の抽出に関しては、DNAウイルスの場合、感染細胞からの抽出法に準じて調整が可能である。一方、RNAウイルス (及び細胞からのRNA調整) の場合、種々の抽出キットが市販されており、各キットに添付されている手順に従うこととRNAの調整が可能である。一例をあげると、宝酒造のCatrimox-14 RNA Isolation Kit RIK 2.11wを用いた場合、RNAウイルスを含む液に、等量のCatrimox-14を混合し、5分間遠心することでRNAが沈査として回収される。例えば、バキュロウイルスP35遺伝子の場合、バキュロウイルス感染細胞あるいはバキュロウイルス液から前述のような方法でPCRの鋳型となるDNAを調製することが可能である。

【0028】

後者の場合、フィブリノゲンの α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードするcDNAは、以下のように調製される。まず、ヒト肝細胞から全RNAを抽出し、この中からmRNAを精製する。得られたmRNAをcDNAに変換した後、それぞれの遺伝子配列に合わせてデザインされたPCRプライマーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物をプラスミドベクターに組込み大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中から目的の蛋白をコードするcDNAを有するクローンを選択する。上記の全RNAの抽出には、市販のTRIzol試薬 (GIBCO BRL社)、ISOGEN (ニッポンジーン社) 等の試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit (Amersham BioSciences社) などの市販キット、cDNAへの変換には、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning (GIBCO BRL社) などの市販のcDNAライブラリー作製キットがそれぞれ使用される。ヒトフィブリノゲン遺伝子を取得する場合は、市販のcDNAライブラリー、例えば、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BC Bioscience) が用いられる。

【0029】

PCR用プライマーは、DNA合成受託機関 (例えばQIAGEN社) などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5'側にKOZAK配列 (Kozak M, J. Mol. Biol., 196, 947 (1987)) 及び適切な制限酵素切断部位の配列を付加することが望ましい。好ましくは、配列番号1から6、10、11に記載の合成DNAがプライマーとして用いられる。PCR反応は、市販のAdvantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience) を用い、添付のプロトコールに従って行えばよい。PCRにより得られたDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット (インピトロジェン社) 等を用いてクローニングした後、DNAシークエンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ社) により決定される。

【0030】

このようにして本願発明に必要な所望の遺伝子を入手することができる。その一例として、バキュロウイルスP35遺伝子は、好ましくは配列番号12記載の配列を有する遺伝子断片として得られる。また、フィブリノゲン遺伝子は、好ましくは配列番号7から9記載の配列を有する遺伝子断片として得られる。これらの遺伝子を用いて動物細胞に組み込む為の発現ベクターが構築される。動物細胞を宿主とする発現ベクターには特段の制約はないが、プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリ β アクチンなど、最終的に所望の遺伝子産物が得られるのであれば如何なるものでも良い。また適当なエンハンサーと組み合わせても構わない。好ましくは、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGG (特開平3-168087) が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカー遺伝子として機能するものであればいかなるものでも使用可能である。一般的には、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカー遺伝子 (Kriegler M著、加藤郁之進 監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994)) が利用できる。

【0031】

以上述べた要素を組み合わせて構築される発現ベクターの好ましい例として、バキュロウイルスP35遺伝子の場合には、図2に示すベクターが挙げられる。フィブリノゲン遺伝子の場合には、 γ 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターと γ 鎖及び α 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターが挙げられる。より好ましくは、図1に示すpCAG GD-GB (フィブリノゲン γ 鎖と β 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカーとしてdhfr遺伝子を持つ) とpCAGGDN5-GA (フィブリノゲン γ 鎖と α 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカーとしてdhfr遺伝子及びneo遺伝子を持つ) が挙げられる。この3種類の発現ベクターは、動物細胞に導入される。しかしながら、本願発明はこれらの例に限定されるものではない。基本的にバキュロウイルスP35遺伝子に代表されるカスペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子と、フィブリノゲンを構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種の遺伝子に代表される目的タンパク質遺伝子が同一細胞内で同時に発現できる形であれば特段の制限はない。バキュロウイルスP35遺伝子に代表されるカスペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子の発現ベクターと、フィブリノゲンを構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種の遺伝子に代表される目的タンパク質遺伝子の発現ベクターの導入時期や導入の順番にも特段の制限はない。例えば、宿主細胞にカスペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子の発現ベクターと目的タンパク質発現ベクターを同時に導入しても良いし、別々の時期に導入しても構わない。予め宿主細胞にカスペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子の発現ベクターを導入して新たな宿主細胞とすれば、より一層汎用性が増す。ただし、カスペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターと目的のタンパク質遺伝子を有する発現ベクターとを別々の時期に宿主細胞に導入させる場合には、それぞれの発現ベクターの持つ選択マーカー遺伝子に各々異なったものを使う必要がある。

【0032】

発現ベクターを導入する宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞やSP2/0等マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞、COS細胞など様々な動物細胞が利用可能であるが、発現ベクターに使用されるプロモーター、選択及び遺伝子増幅用マーカー遺伝子に合わせて適当な細胞を選択すれば良い。例えば、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドを用いて構築した発現ベクターには、CHO細胞などが使用される。

【0033】

宿主細胞の形質転換を行うときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい (Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3

、Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))。

【0034】

形質転換細胞の選択・増殖には、一般に動物細胞を形質転換する時に行われる方法を用すればよい。例えば、形質転換後の細胞は、CHO-S-SFMII培地 (GIBCO-BRL)、IS CHO-V培地(アイエスジャパン)、YMM培地等無血清培地やMEMアルファ培地、RPMI培地、ダルベッコMEM培地 (いずれもGIBCO-BRL) に5-10%程度のウシ胎児血清を添加した血清培地などの一般的に動物細胞培養に用いられる培地に、使用する選択マーカーに合わせてメトトレキサート、G418、ピューロマイシン等を添加した選択培地を用いて、適宜培地交換をしながら、37℃前後で10~14日間程度培養される。この培養により、形質転換されていない細胞は死滅し、形質転換した細胞のみが増殖してくる。更に、形質転換細胞に対して、限界希釈法などの方法により、目的とするタンパク質産生細胞株の選択及びクローニングが行われる。培養方法には、細胞の種類によって、また目的タンパク質の性状にあわせて種々の検出方法が使用可能である。一般的に、目的タンパク質の検出・発現量の測定には、蛋白質やポリペプチドの検出に用いられる方法、すなわち、ELISA、RIA、WB、SDS-PAGE等の方法を利用すれば良い。また、目的タンパク質が何らかの活性を保有する場合はその活性を直接測定しても良い。

【0035】

このようにして得られた組換え細胞は、細胞増殖における定常期を延長する以外に、細胞増殖能力を増強する効果も認められ、従来Bcl-2などの抗アポトーシス因子で報告されていた生存率の延長効果以外の能力も獲得できるようになる。そして最も重要な目的タンパク質の産生量を、従来報告がなかったほど大幅に増加させることができるようになる。フィブリノゲン産生細胞及びバキュロウイルスP35を一例としてその効果を調べた結果、従来技術によるフィブリノゲンの産生量は最大約15μg/mlであったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合で最終的に約31倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約704~3344μg/mlの潜在的な産生量をもつと推定される。このように本願発明の方法によって、これまでにない組換えタンパク質を高産生する細胞が得られる効果が期待できる。本願発明は、フェドバッチ培養、パーフュージョン培養など育種方法との併用も可能であるので、組換え細胞の目的タンパク質産生能をさらに増強することができる。故に、本願発明は、従来では動物細胞では生産が難しく、産業化が難しかったタンパク質の事業化ならびに、すでに事業化されているタンパク質生産においてもさらなる産生量増強による大幅なコストダウンを可能にするものである。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社、アマシャムファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

【実施例1】

【0036】

(フィブリノゲン遺伝子の単離)

ヒトフィブリノゲン遺伝子は、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BC Bioscience)をテンプレートとし、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖用にそれぞれ2本ずつ作製し (配列番号1~6)、Advantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience)を用いてキットのプロトコールに従ってPCR反応を行った。この結果、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖それぞれにPCR增幅のバンドが検出された。そのサイズは既知の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖cDNA遺伝子のサイズと一致していたため、これらの遺伝子をTAクローニングキット (インビトロジェン) を用いてクローニング (各々pFbgA、pFbgB、pFbgG) し、その塩基配列の決定をABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ) を用いて行った。その結果、配列番号7~9にそれぞれ示すFbgA、FbgB、FbgG遺伝子が得られた。

【実施例2】

【0037】

(フィブリノゲン遺伝子発現ベクターの構築)

本実施例に用いたフィブリノゲン β 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGD-GBならびに、フィブリノゲン α 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGDN5-GAは以下のようにして構築した。pCAGGD-GBについては、まず、pCAGG-S1 dhfr (WO 03/004641) をBamHIにて消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー（宝）を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 dhfrNを構築し、これのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子のSalI断片を組込み、pCAGGD-Gを構築した。さらに、pCAGG(Xho) (WO 03/004641) をSalIで消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー（宝）を用いてライゲーションすることによりpCAGG(Xho) Nを構築し、このプラスミドのXbaI-BamHIサイトに、pCAGG-S1 (WO 03/004641) のSalIを含むXbaI-BamHI断片を組込み、得られたプラスミドのBamHIサイトを消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー（宝）を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 2Nを構築した。このpCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子のSalI断片を組込み、pCAGG-Bを構築した。pCAGGD-GのNotIサイトにpCAGG-BのFbgG遺伝子を含むNotI断片を組込み、最終的なフィブリノゲン β 鎖と γ 鎖の発現ベクターpCAGGD-GB（図1）を構築した。

【0038】

一方、pCAGGDN5-GAについては、最初にpCAGG-S1 dhfr neo (WO 03/004641) を不完全なBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、そのまま自己ライゲーションすることにより2つあるBamHIサイトのうちneo遺伝子の3'側にあるBamHIサイトを消失させ、さらにBamHIで消化して、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、リン酸化NotIリンカー（宝）を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 dhfr neoN (pCAGGDN5-NotI)を構築した。このpCAGG-S1 dhfr neoNのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したプラスミドのNotIサイトに、pCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgA由来のFbgA遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したpCAGG-AのFbgA遺伝子を含むNotI断片を組込み、pCAGGDN5-GA（図1）を構築した。

【実施例3】

【0039】

（組換えフィブリノゲン発現細胞の作製：発現ベクターの細胞への導入、遺伝子増幅、クローニング）

実施例2で構築したフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを用いて以下に述べる方法にて、CHO DG44 (Urlaub Gら, Somatic cell. Mol. Genet., 12, 555 (1986)、以下CHO) 細胞を形質転換した。形質転換の前日にCHO細胞を6 wellプレートに1-0.5×10⁵ cells/2 ml/wellの細胞密度で10%ウシ胎児血清 (FCS、GIBCO-BRL社製) を含むYMM培地（インシュリン・トランスフェリン・エタノールアミン・亜セレン酸ナトリウムを含むアミノ酸・ビタミンを強化した核酸不含MEMアルファ培地）を用い播種した。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養の後、リポソーム系形質転換試薬、TransIT-LT1（宝）あるいはリポフェクトアミン2000（インビトロジエン）を用いて、あらかじめフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを各々等量混合し、PvuIで消化・線状化しておいたものを導入DNAとして、それぞれのプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養した後、選択培地、10%透析FCS (d-FCS: GIBCO-BRL社製)、0.5 mg/ml Geneticin (G418: GIBCO-BRL社製)、100nM メトトレキサート (MTX: 和光純薬工業製) を含むYMM培地、あるいは10% d-FCS、0.5 mg/ml G418を含むYMM培地に培地交換した。3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

【0040】

得られた形質転換細胞の組換えフィブリノゲン産生をELISAにて測定した。ELISAは以下に示す手順にて実施した。PBS (137mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄-12H₂O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄) で10 μg/mlに調製した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体 (Dako Cytomation) 100 μlをイムノモジュールプレート（ヌンク C8-445101）にアプライし、4℃に一晩置くことで固相化を行った。固相化したプレートの抗体溶液を除き、PBS 390 μl

にて3回洗浄した。続いて、PBSで4倍に希釈したブロックエース（大日本製薬）を370 μ lアプライし、室温で30分から2時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロッキング液を除き、サンプル（培養上清）およびスタンダードを100 μ lアプライした。サンプル（フィブリノゲン産生細胞の培養上清）は、PBSで10倍に希釈したブロックエースを用いて100～800倍に希釈した。スタンダードには、Bolheal（化血研製：血漿由来のフィブリノゲンを含むバイヤル1を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を80mg/mlとして計算し、PBSで1mg/mlに希釈した。）をサンプルと同じ希釈液にて100ng/ml～1ng/mlに希釈したもの用いた。サンプルおよびスタンダードは、プレートにアプライ後、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液（0.05% Tween-20/PBS）390 μ lにて4回洗浄を行い、続いて、サンプル希釈に用いた溶液（PBSで10倍に希釈したブロックエース）で8000倍に希釈した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体・パーオキシダーゼ標識を100 μ lアプライし、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液（0.05% Tween-20/PBS）390 μ lにて4回洗浄を行った。発色は、TMB Substrate Kit (Kirkegaard&Perry Laboratories, Inc.) 100 μ lをアプライし、暗所で30分静置後、1規定硫酸 100 μ lで反応を停止した。反応停止後30分以内に、プレートリーダー（モレキュラーデバイス）にて、450nm-650nmの吸光度を測定し、検量線からフィブリノゲン濃度を求めた。

【0041】

このELISAにて組換えフィブリノゲン産生能の高い形質転換細胞を選び出し、次にMTX遺伝子増幅を行った。10% d-FCS、0.5 mg/ml G418を含み、段階的にMTX濃度を上げたYMM培地に細胞を懸濁し、24 well プレートに5x10⁴ cells / 0.5ml / wellにて播種し、3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、高濃度のMTXに耐性の形質転換体を得た。その結果約20～45 μ g/mlの産生量（細胞がコンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量）をもつ細胞が得られた。さらに、そのような組換えフィブリノゲン産生細胞のクローニングを行った。10% d-FCSを含むYMM培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに1個/200 μ l/wellずつ播種することでクローニングを行った。得られたクローンについて、コンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量を調べたところ、～56.8 μ g/mlに達するクローンが得られた。その中の一つのクローンCH002-24-4を10% d-FCS、0.5mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、6 wellプレートに2x10⁵ cells / 2ml / wellで播種し、4日間の培養を行い、培養上清中の組換えフィブリノゲンの量をELISA法にて測定したところ、103.3 μ g/mlに達しており、動物細胞による組換えフィブリノゲンの産生量として100 μ g/mlのオーダーを初めて超えたことを示した。

【実施例4】

【0042】

（組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養）

組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養時の産生能を調べた。実施例3において100 μ g/ml以上の産生量を示したクローンCH002-24-4を、PBSにて2回洗浄後、表1に示す培地（CHO-S-SFMII、IS CHO-Vは無血清培地、10%d-FCS/YMMは血清培地）にそれぞれ懸濁し、10⁵ cells/mlで2ml/well of 6well プレートで播種し、4日間培養を行い、得られた細胞数のカウントと培養上清中のフィブリノゲン産生量を前述のELISAにて測定した。その結果、表1に示すように、1x10⁴ cells当たりの組換えフィブリノゲン産生能は、血清培地（10%d-FCSを含むYMM培地）を用いた場合より高く、無血清培地でも血清培地と同等以上の産生能力があることが示された。このことは、一般的な高密度培養の場合1～2x10⁶ cells/mlは達成可能であるので、培養条件さえ良ければ、単純計算で440～1520 μ g/ml以上の組換えフィブリノゲンを産生させる潜在能力があることを示している。

【0043】

【表1】

培地	メーカー	産生量 ($\mu\text{g}/1\times10^4\text{ cells}$)
10%d-FCS/YMM	自家調製	2.0
CHO-S-SFMII	GIBCO	4.4
IS CHO-V	アイエスジャパン	7.6

【0044】

さらに、このCHO-S-SFMII培地で増殖したCH002-24-4細胞を、同じくCHO-S-SFMII培地を基本とした改良型無血清培地100mlに $1.6\times10^5\text{ cells/ml}$ で播種し、techne社製のスピナーフラスコを用いた約2週間の浮遊培養(回転数45rpm)で $272.7\mu\text{g}/\text{ml}$ という産生量を達成した。このように、本願発明の方法により確立した細胞が、組換えフィブリノゲン産生に関して無血清培地で~約 $270\mu\text{g}/\text{ml}$ の産生量を達成し、これまでにない高産生細胞であることが示された。

【実施例5】

【0045】

(P35遺伝子のクローニングと発現ベクター構築)

バキュロウイルスAcNPV (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Invitrogenより購入)由来のウイルス液($2\times10^7\text{ pf/ml}$)からプロテナーゼK処理、フェノール抽出によりウイルスゲノムを調製し、これを鋳型として、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを5'用、3'用の2本作製し(配列番号10、11)、Advantage HF-2 PCR Kit(クロンテック)を用いてPCR反応を行った。PCR産物のサイズは既知のP35遺伝子のサイズと一致していたため、これをTAクローニング(Invitrogen)した。得られたプラスミドについて、その塩基配列の決定をABI PRISM310 Genetic Analyzer(PEバイオシステムズ)を用いて行った結果、文献(Friesen PD, Miller LK., J Virol. 61(7): 2264-72. 1987)の配列と同じ配列を持ったpP35遺伝子クローン(配列番号12)が得られた。

【0046】

すでにフィブリノゲンを発現している細胞にP35遺伝子を導入するために、まず選択メーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子をもったベクターを構築した。23番目のセリンをアルギニンに変換した変異DHFRを持った発現プラスミドpCAGG-S1 mdhfr (WO 03/004641)のSapI、NotIサイト間にBamHIサイトを挿入するために、GGC CGC GGA TCC GCT CTT CC及びAGC GGA AGA GCG GAT CCG Cの2つのリンカーを合成し、リンカーライゲーションを行い、pCAGGM5を構築した。さらに、pCAGGM5のBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、XhoIリンカー(宝)を用いたリンカーライゲーションさせることによりXhoIを導入した。このプラスミドのXhoIサイトにpPGKpuro (Watanabe, S., Kai, N., Yasuda, M., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. (1995).)のpuromycin耐性遺伝子を含むSalI断片を挿入してpCAGGMP5-NotIを構築した。次にこのプラスミドから変異DHFR (mdhfr) 遺伝子を含むSalI-NotI断片を除き、代わりにpCAGGDN5-NotIのDHFR遺伝子を含むSalI-NotI断片を挿入してpCAGGDP5-NotIを構築した。pCAGGDP5-NotIのSalIサイトにPCRクローニングしたp35遺伝子のXhoI断片を挿入し、目的のpCAGGDP5-p35(図2)を構築した。

【実施例6】

【0047】

(P35遺伝子形質転換細胞)

実施例4で構築したP35発現プラスミドpCAGGDP5-p35を用いて以下に述べる方法にて、組換えフィブリノゲン産生クローン、CH002-24-4細胞を形質転換した。CH002-24-4細胞を12wellプレートに $1-0.5\times10^5\text{ cells/ml/well}$ の細胞密度でCHO-S-SFMII培地(GIBCO-BRL)を用い播種した。リポソーム系形質転換試薬であるリポフェクトアミン2000(インビトロジエン)を用いて、あらかじめP35発現プラスミドpCAGGDP5-p35をPvuIで消化・線状化し

ておいたものを導入DNAとして、リポフェクトアミン2000のプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養した後、選択培地として4μg/ml puromycin（クロンテック）を含むCHO-S-SFMII培地に交換した。3～4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

【0048】

導入したP35遺伝子の効果を調べるために、得られたP35遺伝子形質転換体の一つであるP9GD細胞とその親株である2-24-4細胞をCHO-S-SFMII培地100mlに約1.0x10⁵cells/mlで播種し、techne社製のスピナーフラスコを用いた約2週間の浮遊培養（回転数45rpm）を行い、増殖曲線、生存率、フィブリノゲン産生量を調べた。その結果、図3に示すように、最大細胞密度でP9GD細胞が2.2x10⁶cells/ml、2-24-4細胞が7.2x10⁵cells/mlと約3倍に増加していた。また、P9GD細胞が50%生存率に達するのが2-24-4細胞に比べ3日遅くなった。結果として、培養15日目の産生量は、P9GD細胞が365.2μg/mlに対し2-24-4細胞は162.7μg/mlとなり約2.2倍に増加した。さらに、CHO-S-SFMII培地を基本とした改良型無血清培地を用いて同様にスピナー培養を行ったところ、生存率ではほとんど差が無かったが、最大細胞密度ではP9GD細胞の2.5x10⁶cells/mlに対し、2-24-4細胞が9.4x10⁵cells/mlと約2.6倍に増加していた。さらに、培養15日での産生量については、P9GD細胞が463.7μg/mlに対し2-24-4細胞は295.6μg/mlとなり約1.6倍に増加した。課題を解決するための手段の項で述べたように本発明以前に知られていたフィブリノゲンの最大産生量は約15μg/mlであったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合、最終的に463.7μg/mlとなり、約31倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子導入の親株となった2-24-4細胞の潜在的なフィブリノゲン産生能力が440～1520μg/ml以上と推定されているので、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約704～3344μg/mlの潜在的な産生量をもつと推定される。このように、本願発明の方法により確立された細胞がこれまでにない組換えタンパク質を高産生する細胞であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0049】

本発明方法を使用すれば、目的タンパク質を高生産することが可能となるので、産業上の利用可能性が高いものである。

また、本発明により得られるタンパク質遺伝子導入前のカスペース活性阻害因子をコードする遺伝子による形質転換細胞は、產生させる目的のタンパク質遺伝子を導入するのみで目的とするタンパク質を大量に生産することが可能となるため、幅広い分野で幅広い目的タンパク質の生産に利用可能となる。

特に本願発明により得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞は、組換えフィブリノゲンを高産生するので、モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製する際の抗原として、あるいは、抗ヒトフィブリノゲン抗体とフィブリノゲンとの結合に関する研究材料として利用できる。更に、本願発明で得られるフィブリノゲンは、血液由来のフィブリノゲンと異なり、フィブリノゲン以外の血液凝固や線溶関連の因子を含まない純粋なフィブリノゲンとして調製可能である。従って、血液凝固・線溶に関する研究の研究材料としても有用である。また、フィブリノゲンを抗原として単独で又は種々の安定剤、保護剤、防腐剤等の添加物と共に用いることにより、各種疾患に対する病態悪化阻止、予防または治療剤等医薬品の提供を可能ならしめるものである。例えば、DICのような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。また、本願発明の組換えヒトフィブリノゲンは、フィブリノゲンの膠着性を利用して組織接着剤として、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアーリークの閉鎖など広範にわたる治療、あるいは組織再生を目的とした再生医療の基剤に対する好適な薬として利用される。

このように、本願発明の方法により得られる組換えフィブリノゲン産生細胞及び当該細胞により得られる組換えヒトフィブリノゲンは、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】組換えフィブリノゲン産生細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

【図2】バキュロウイルスP35遺伝子発現細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

【図3】バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

【図4】バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH =
INSTITUTE

<120> Transfomed cell, method for producing same and method for =
producing high yield protein using said transformant

<130> 2003YS1024

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

ccccaaaggctt gtcgacgcca ccatgttttc catgaggatc gtctg

45

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ccatcgatgg atccgtcgac ttactagggg gacagggaag gcttcccaa aggagaagt

60

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ccccaaaggctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattatttgc ctactattgt gtgttttct

60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

cggaattctg atcagtcgac ttactattgc tgtggaaaga agggcctgat cttcataactc

60

<210> 5
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 5
 ccccaagctt gtcgacgcca ccatgagttg gtccttgcac ccccgaaatt taattc 56

<210> 6
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 6
 cggaattcgg atccgtcgac ttattaaacg tctccagcct gtttggctcc c 51

<210> 7
 <211> 1980
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 7
 ccccaagctt gtcgacgcca ccatgtttc catgaggatc gtctgcctgg tcctaagtgt 60
 ggtggcaca gcatggactg cagatagtgg tgaaggtgac tttctagctg aaggaggagg 120
 cgtgcgtggc ccaagggttg tggaaagaca tcaatctgcc tgcaaagatt cagactggcc 180
 cttctgctct gatgaagact ggaactacaa atgcccttct ggctgcagga tgaagggtt 240
 gattgatgaa gtcaatcaag atttacaaa cagaataaat aagctcaaaa attcactatt 300
 tgaatatcag aagaacaata aggattctca ttcgttgacc actaatataa tggaaatttt 360
 gagaggcgat tttccctcag ccaataaccg tgataatacc tacaaccgag tgtcagagga 420
 tctgagaagc agaattgaag tcctgaagcg caaagtata gaaaaagtac agcatatcca 480
 gcttctgcag aaaaatgtta gagtcagtt ggttgatatg aaacgactgg aggtggacat 540
 tgatattaag atccgatctt gtcgagggtc atgcagtagg gcttagctc gtgaagtaga 600
 tctgaaggac tatgaagatc agcagaagca acttgaacag gtcattgcc aagacttact 660
 tccctctaga gataggcaac acttaccact gataaaaatg aaaccagttc cagacttgg 720
 tcccggaaat tttaagagcc agttcagaa ggtacccca gagtggaagg cattaacaga 780

catgccgcag atgagaatgg agtttagagag acctggtgga aatgagattt ctcgaggagg	840
ctccacctct tatggAACCG gatcagagac ggaaagcccc aggaacccta gcagtgcTgg	900
aagcttggAAC tctgggagct ctggacctgg aagtacttgg aaccggaaacc ctgggagctc	960
tgggacttgg aggactgcaa cctggAAacc tgggagctct ggacctggaa gtacttggaa	1020
ctggAAactct gggagctctg gaacttggaaag tacttggAAac caaaaccctg ggagccctag	1080
acctggtagt accggAACctt ggaatccctgg cagctctgaa cgcggAAgtt ctgggactt	1140
gacctctgag agctctgtat ctggtagtac tggacaatgg cactctgaat ctggaaagttt	1200
tagggcagat agcccaggct ctgggAACgc gaggcctaAC aacccagact ggggcacatt	1260
tgaagagggt tcaggAAatg taagtccagg gacaaggaga gagtaccaca cagaaaaact	1320
ggtcacttctt aaaggagata aagagctcag gactggtaaa gagaaggta cctctggtag	1380
cacaaccacc acgcgtcgTT catgctctaa aaccgttact aagactgttA ttggccttga	1440
tggtcacaaa gaagttacca aagaagggtt gacccctggaa gatggttctg actgtcccga	1500
ggcaatggat ttaggcacat tgtctggcat aggtactctg gatgggttcc gccataggca	1560
ccctgatgaa gctgcTTct tcgacactgc ctcaacttgg aaaaacattcc caggTTtctt	1620
ctcacctatg ttaggagagt ttgtcagtta gactgagtct aggggctcag aatctggcat	1680
cttcacaaaat acaaaggaaat ccagttctca tcaccctggg atagctgaat tcccttcccg	1740
tggtaaatct tcaagttaca gcaaacaatt tacttagtagc acgagttaca acagaggaga	1800
ctccacattt gaaaggcaaga gctataaaat ggcagatgag gccggAAgtt aagccgatca	1860
tgaaggAACa catagcacca agagaggcca tgctaaatct cggccctgtca gaggtatcca	1920
cacttctcct ttgggAAAGC cttccctgtc cccctagtaa gtcgacggat ccatcgatgg	1980

<210> 8
 <211> 1479
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 8
 ccccaagctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattatttgc ctactattgt gtgttttctt 60

agttaagtcc caagggtgtca acgacaatga ggagggttc ttcagtgcac gtggtcatcg	120
accccttgcac aagaagagag aagaggctcc cagcctgagg cctgccccac cgcccatcag	180
tggaggtggc tatcgggctc gtccagccaa agcagctgcc actcaaaaga aagtagaaag	240
aaaagccctt gatgctggag gctgtctca cgctgaccca gacctggggg tttgtgtcc	300
tacaggatgt cagtgcaag aggcttgct acaacaggaa aggccaatca gaaatagtgt	360
tgtatggtta aataacaatg tggaagctgt ttcccagacc tcctcttctt ccttcagta	420
catgtatttg ctgaaagacc tgtggcaaaa gaggcagaag caagtaaaag ataatgaaaa	480
tgtatcaat gagtactcct cagaactgga aaagcaccaa ttatatatag atgagactgt	540
gaatagcaat atcccaacta accttcgtgt gcttcgttca atcctggaaa acctgagaag	600
caaaatacaa aagttagaat ctgatgtctc agctcaaatg gaatattgtc gcaccccatg	660
cactgtcagt tgcaatattc ctgtgggtc tggcaaagaa tgtgagggaaa ttatcagggaa	720
aggaggtgaa acatctgaaa tgtatctcat tcaacctgac agttctgtca aaccgtata	780
agtatactgt gacatgaata cagaaaatgg agatggaca gtgattcaga accgtcaaga	840
cggtatgtt gacttggca ggaaatggga tccatataaa cagggatttgc gaaatgttgc	900
aaccaacaca gatggaaaga attactgtgg cctaccaggta gaatattggc ttggaaatga	960
taaaattagc cagcttacca ggatgggacc cacagaactt ttgatgaaaa tggaggactg	1020
gaaaggagac aaagtaaagg ctcactatgg aggattcact gtacagaatg aagccaaaca	1080
ataccagatc tcagtgaaca aatacagagg aacagccggt aatgcctca tggatggagc	1140
atctcagctg atgggagaaa acaggaccat gaccattcac aacggcatgt tcttcagcac	1200
gtatgacaga gacaatgacg gctggtaac atcagatccc agaaaacagt gttctaaaga	1260
agacgggtggt ggatgggtggt ataatagatg tcatgcagcc aatccaaacg gcagatacta	1320
ctggggtgga cagtacacct gggacatggc aaagcatggc acagatgtatg gtgtatgt	1380
gatgaattgg aaggggtcat ggtactcaat gaggaagatg agtataaga tcaggccctt	1440
tttccacacag caatagtaag tcgactgatc agaattccg	1479

<211> 1359

<212> · DNA

<213> Human

<400> 9

cccccaagctt gtcgacgcca ccatgagttg gtccttgcac ccccggaatt taattctcta 60

cttctatgct cttttatttc tctcttcaac atgtgttagca tatgttgcta ccagagacaa 120

ctgctgcatac tttagatgaaa gattcgtag ttattgtcca actacacctgtg gcattgcaga 180

tttcgtgtct acttatcaaa ccaaagttaga caaggatcta cagtcttgg aagacatctt 240

acatcaagtt gaaaaacaaaaa catcagaagt caaacagctg ataaaaagcaa tccaaactcac 300

ttataatcct gatgaatcat caaaaacccaaa tatgtatagac gctgtctactt tgaagtccag 360

gaaaatgtta gaagaaaattt tggaaatatgtt agcatcgatt ttaaacacatg actcaagttt 420

tcgatatttg cagggaaatataaattcaaaa taatcaaaaag attgttaacc tggaaagagaa 480

ggtagccccag cttagaaggcac agtgccagga accttgcaaa gacacggtgtgc aaatccatga 540

tatcaactggg aaagattgtc aagacattgc caataaggga gctaaacaga gcccccttta 600

ctttatataa cctctgaaag ctaaccagca attcttagtc tactgtgaaa tcgatggtc 660

tggaaatggg tggactgtgt ttccagaagag acttgtatggc agtgttagatt tcaagaaaaaa 720

ctggattcaa tataaagaag gatttgaca tctgtctcct actggcacaa cagaattttg 780

gctggaaaat gagaagattc atttgataag cacacagttt gccatccat atgcattaa 840

agtggaaactg gaagactgttga atggcagaac cagtactgtca gactatggca tggtaagggt 900

gggacactgaa gctgacaagt accggcttaac atatgcttac ttgcgtggtg gggatgtctgg 960

agatgccttt gatggcttgc attttggcga tgatcctagt gacaagtttt tcacatccca 1020

taatggcatg cagttcagta cctggggacaa tgacaaatgtat aagttttgaag gcaactgtgc 1080

tgaacaggat ggatctggtt ggtggatgaa caagtgtcac gctggccatc tcaatggagt 1140

tttattaccaa ggtggccattt actcaaaaggc atctatctctt aatgtttatg ataatggcat 1200

ccccattcaac agacttcacaa ttgggagaagg acagcaacacac caccctggggg ttggccaaaca 1320

ggctggagac gtttaataag tcgacggatc cgaattccg 1359

<210> 10
<211> 60
<212> DNA
<213> Baculovirus

<400> 10
CCGCTCGAGG AATTGCCAC CATGTGTGTA ATTTTCCGG TAGAAATCGA CGTGTCCCAG

<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> Baculovirus

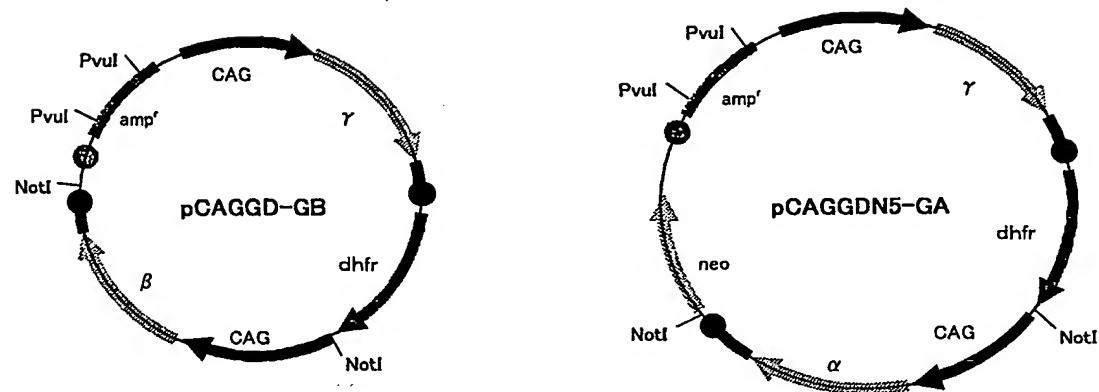
<400> 11
CCGCTCGAGG AATTCTACTC GTAAAGCCAG TTCAATTAA AAAACAAATG ACAT

<210> 12
<211> 1035
<212> DNA
<213> Baculovirus

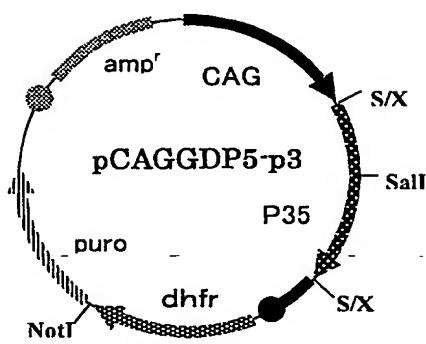
<400> 12
CCGCTCGAGG AATTGCCAC CATGTGTGTA ATTTTCCGG TAGAAATCGA CGTGTCCCAG 60
ACGATTATTC GAGATTGTCA GGTGGACAAA CAAACCAGAG AGTTGGTGTAA CATTAAACAAG 120
ATTATGAACA CGCAATTGAC AAAACCCGTT CTCATGATGT TTAACATTTC GGGTCCTATA 180
CGAAGCGTTA CGCGCAAGAA CAACAATTG CGCGACAGAA TAAAATCAAA AGTCGATGAA 240
CAATTGATC AACTAGAACG CGATTACAGC GATCAAATGG ATGGATTCCA CGATACCATC 300
AAGTATTAA AAGATGAACA CTATTCGGTA AGTTGCCAAA ATGGCAGCGT GTTGAAAAGC 360
AAGTTTGCTA AAATTTAAA GAGTCATGAT TATACCGATA AAAAGTCTAT TGAAGCTTAC 420
GAGAAATACT GTTGGCCCAA ATTGGTCGAC GAACGCAACG ACTACTACGT GGCGGTATGC 480
GTGTTGAAGC CGGGATTGTA GAACGGCAGC AACCAAGTGC TATCTTCGA GTACAACCCG 540
ATTGGTAACA AAGTTATTGT GCCGTTGCT CACGAAATTAA ACGACACGGG ACTTTACGAG 600
TACGACGTCG TAGCTTACGT GGACAGTGTG CAGTTGATG GCGAACAAATT TGAAGAGTTT 660
GTGCAGAGTT TAATATTGCC GTCGTCGTTA AAAAATTCGG AAAAGGTTT ATATTACAAC 720

GAAGCGTCGA AAAACAAAAG CATGATCTAC AAGGCTTAG AGTTACTAC AGAACATCGAGC 780
TGGGGCAAAT CCGAAAAGTA TAATTGGAAA ATTTTTGTA ACGGTTTAT TTATGATAAA 840
AAATCAAAAG TGTTGTATGT TAAATTGCAC AATGTAACTA GTGCACTCAA CAAAAATGTA 900
ATATTAAACA CAATTAAATA AATGTTAAAA TTTATTGCCT AATATTATTT TGTCAATTGCT 960
TGTCAATTAT TAATTGGAT GATGTCATTT GTTTTAAAAA TTGAACGGC TTTACGAGTA 1020
GAATTCCCTCG AGCGG 1035

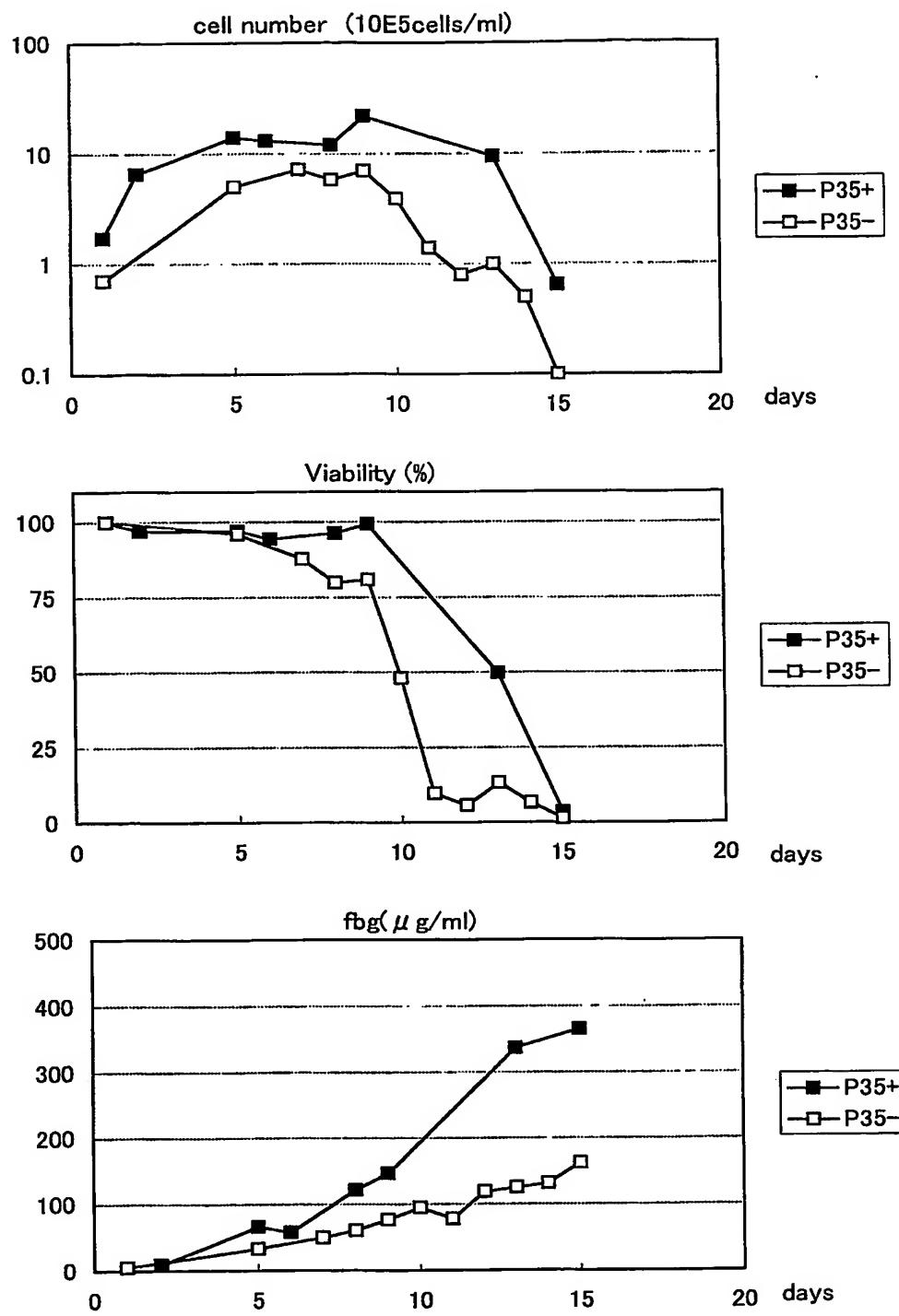
【書類名】 図面
【図 1】



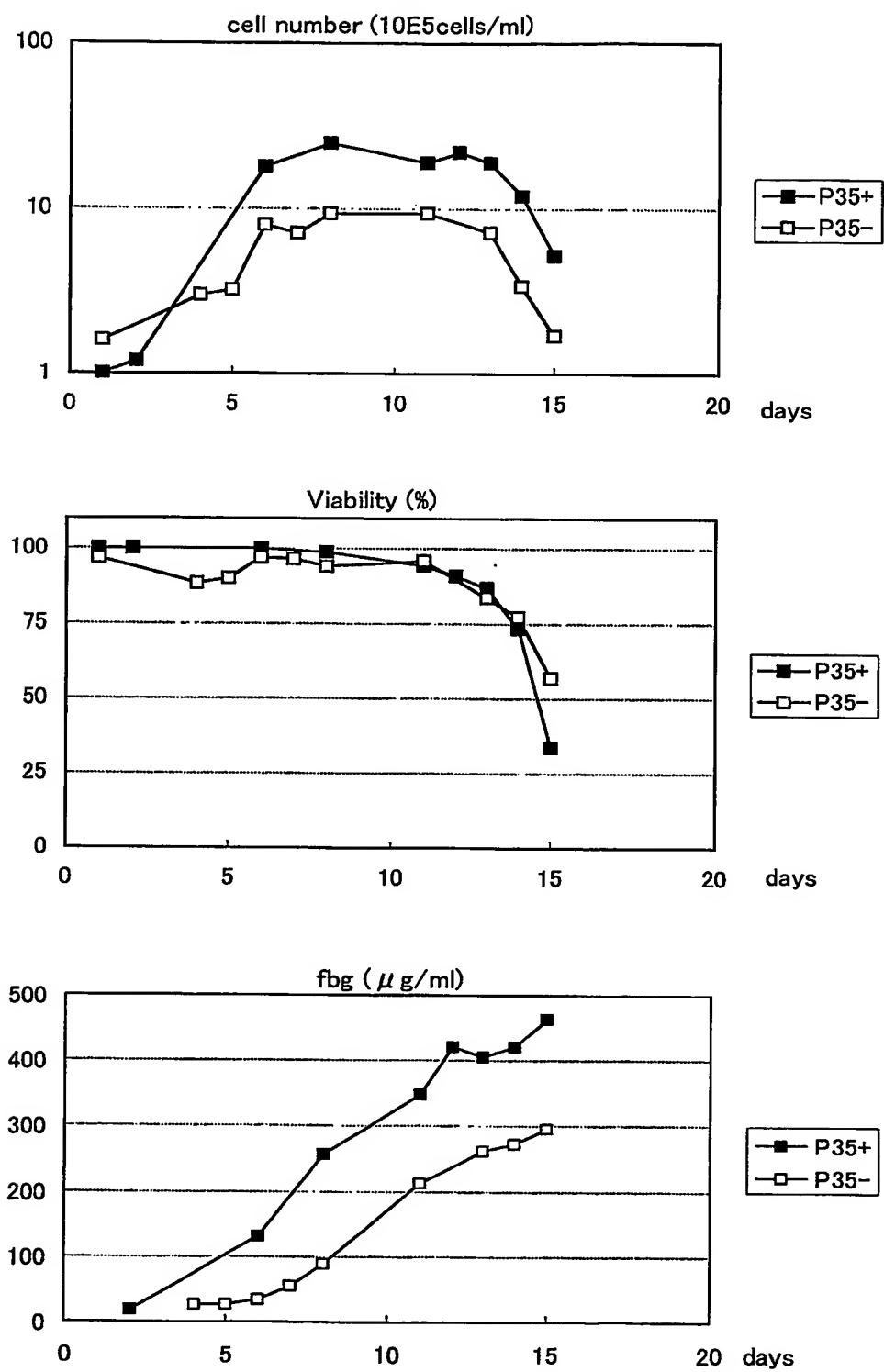
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 目的タンパク質を高產生する組換え產生細胞及びその作製方法さらにはそれを用いたタンパク質の產生量の増加方法の提供

【解決手段】 抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカスペース活性を阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、例えばバキュロウイルスP35遺伝子と目的タンパク質產生遺伝子により組換え動物細胞を作製し、その組換え動物細胞内においてバキュロウイルスP35遺伝子を発現させることにより目的たるタンパク質の高產生を可能とする。

【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-365178
受付番号	50301770163
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成15年11月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年10月24日
-------	-------------

特願 2003-365178

出願人履歴情報

識別番号 [000173555]

1. 変更年月日 1996年 3月 4日

[変更理由] 住所変更

住所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
氏名 財団法人化学及血清療法研究所